

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP04/053726

International filing date: 29 December 2004 (29.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: IT
Number: TO2003A001048
Filing date: 30 December 2003 (30.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 06 April 2005 (06.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2



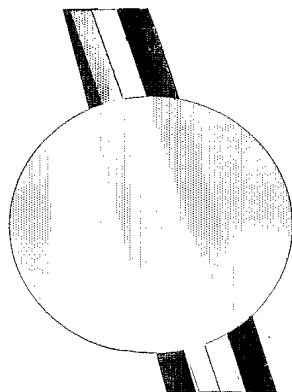
**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. TO 2003 A 001048.**

EP/04/53726

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

07 FEB. 2003

ROMA li.....



IL FUNZIONARIO

Paola Giuliano
Dr.ssa Paola Giuliano

MODULO A (1/2)

AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N°

Ns. Rif.: 3/3956

CAMERA DI
INDUSTRIA
DI TORINO



COMITA

10 2003A001048

A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME o DENOMINAZIONE	A1	BENATTI UMBERTO		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	PF	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3 BNTMRT49C20D969N
INDIRIZZO COMPLETO	A4	VIA ACQUARONE 10/7 - 16125 GENOVA		
COGNOME E NOME o DENOMINAZIONE	A1	BRANDI GIORGIO		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	PF	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3 BRNGRG56B29L500U
INDIRIZZO COMPLETO	A4	VIA DEI PARTIGIANI 14 - 61033 FERMIGNANO (PU)		
B. RECAPITO OBBLIGATORIO IN MANCANZA DI MANDATARIO	B0	(D = DOMICILIO ELETTIVO, R = RAPPRESENTANTE)		
COGNOME E NOME o DENOMINAZIONE	B1			
INDIRIZZO	B2			
CAP/ LOCALITA'/PROVINCIA	B3			
C. TITOLO	CI	DERIVATI DEL GLUTATIONE E LORO UTILIZZI PER IL TRATTAMENTO DI MALATTIE VIRALI		

D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)

COGNOME E NOME	D1	BENATTI Umberto
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	BRANDI Giorgio
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	GARACI Enrico
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	MAGNANI Mauro
NAZIONALITA'	D2	

E. CLASSE PROPOSTA

SEZIONE	CLASSE	SOTTOCLASSE	GRUPPO	SOTTOGRUPPO
E1	E2	E3	E4	E5

F. PRIORITA'

DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO o ORGANIZZAZIONE	F1		Tipo	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	/ /
STATO o ORGANIZZAZIONE	F1		Tipo	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	/ /
G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI	G1				
FIRMA DEL / DEI RICHIEDENTE / I					

999 B - LOVINO Paolo
STUDIO TORTA S.R.L.



MODULO A (2/2)

I. MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIBM

LA/E SOTTOINDICATA/E PERSONA/E HA/HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTI AD ESSA CONNESSI (DPR 20.10.1998 n. 403).

NUMERO ISCRIZIONE ALBO E NOME:	I1	251/BM BOGGIO LUIGI; 615/BM BONGIOVANNI SIMONE; 533/BM BORRELLI RAFFAELE; 426/BM CERBARO ELENA; 482/BM FRANZOLIN LUIGI; 294/BM JORIO PAOLO; 123/BM LO CIGNO GIOVANNI; 987/BM MACCAGNAN MATTEO; 359/BM MODUGNO CORRADO; 358/BM PLEBANI RINALDO; 252/BM PRATO ROBERTO; 545/BM REVELLI GIANCARLO; 842/B BELLEMO MATTEO; 843/B BERGADANO MIRKO; 959/B CERNUZZI DANIELE; 846/B D'ANGELO FABIO; 847/B ECCETTO MAURO; 999/B LOVINO PAOLO; 1000/B MANCONI STEFANO; 1001/B MANGINI SIMONE
DENOMINAZIONE STUDIO	I2	STUDIO TORTA S.r.l.
INDIRIZZO	I3	Via Viotti, 9
CAP/LOCALITÀ/PROVINCIA	I4	10121 TORINO (TO)
L. ANNOTAZIONI SPECIALI	L1	Per la migliore comprensione dell'invenzione è stato necessario depositare disegni con diciture come convenuto dalla Convenzione Europea sulle formalità alle quali l'Italia ha aderito. Le lettere d'incarico seguono.

M. DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE

Tipo Documento	N. Es. All.	N. Es. Ris.	N. Pag. per Esemplare
PROSPETTO A, DESCRIZ., RIVENDICAZ. (OBBLIGATORI 2 ESEMPLARI)	2		26
DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN DESCRIZIONE, 2 ESEMPLARI)	2		3
DESIGNAZIONE D'INVENTORE	1		
DOCUMENTI DI PRIORITÀ CON TRADUZIONE IN ITALIANO			
AUTORIZZAZIONE O ATTO DI CESSIONE			

(SI/NO)

LETTERA D'INCARICO

NO

PROCURA GENERALE

NO

RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE

NO

(LIRE/EURO)

IMPORTO VERSATO ESPRESSO IN LETTERE

ATTESTATI DI VERSAMENTO

Euro

DUECENTONOVANTUNO/80

FOGLIO AGGIUNTIVO PER I SEGUENTI PARAGRAFI (BARRARE I PRESCELTI) DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COPIA AUTENTICA? (SI/NO)

A X

D X

F

SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO? (SI/NO)

SI

NO

DATA DI COMPILAZIONE

30/12/2003

FIRMA DEL/DEI
RICHIEDENTE/I

Paolo Lovino

999 B - LOVINO Paolo
STUDIO TORTA S.R.L.

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA	TO 2003A001048		Cod. 01
C.C.I.A.A. DI	TORINO		
IN DATA	30/12/2003	IL/I RICHIEDENTE/I SOPRAINDICATO/I HA/HANNO PRESENTATO A ME SOTTOSCRITTO	
LA PRESENTE DOMANDA, CORREDATA DI N.	2	FOGLI AGGIUNTIVI, PER LA CONCESSIONE DEL BREVETTO SOPRA RIPORTATO.	
N. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE	<p>RISERVA NON PREVISTA DAL D.M. 9-5-2003 n. 171</p>		
STUDIO IL DEPOSITANTE	<p>STUDIO TORTA S.R.L.</p>	<p>TIMBRO CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIE, ARTIGIANATO E AGRICOLTURA DI TORINO</p>	<p>L'UFFICIALE ROGANTE Mirella CAVALLARI CATEGORIA C</p>

FOGLIO AGGIUNTIVO MODULO A

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

10 2003A001048

FOGLIO AGGIUNTIVO N.

01

DI TOTALI:

02

A. RICHIEDENTE/I

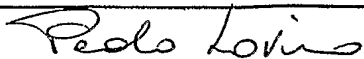
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	GARACI ENRICO		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	PF	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3 GRCNRC42D23H501D
INDIRIZZO COMPLETO	A4	VIA SALARIA 237 00198 ROMA		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	MAGNANI MAURO		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	PF	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3 MGNMRA53D09H921I
INDIRIZZO COMPLETO	A4	TORRE SAN TOMMASO 61029 URBINO		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	MILLO ENRICO		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	PF	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3 MLLNRC68E25D969Y
INDIRIZZO COMPLETO	A4	CORSO EUROPA 632/7 16148 GENOVA		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	PALAMARA ANNA TERESA		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	PF	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3 PLMNTR57S58E243W
INDIRIZZO COMPLETO	A4	VIA CARDINAL DE LUCA, 22 00196 ROMA		

D. INVENTORE/I DESIGNATO/I

COGNOME E NOME	D1	MILLO Enrico
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	PALAMARA Anna Teresa
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	ROSSI Luigia
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	

F. PRIORITA'

DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
FIRMA DEL / DEI RICHIEDENTE / I			999 B - LOVINO Paolo STUDIO TORTA S.R.L.		

FOGLIO AGGIUNTIVO MODULO A

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N°

FOGLIO AGGIUNTIVO N.

02

DI TOTALI:

02

TO 2003A0010481

A. RICHIEDENTE/I

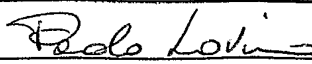
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	ROSSI LUIGIA		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	PF	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3 RSSLGU59T54L500D
INDIRIZZO COMPLETO	A4	VIA G. SANI 2 61029 URBINO		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2		COD.FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4			
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2		COD.FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4			
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2		COD.FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4			

D. INVENTORE/I DESIGNATO/I

COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	

F. PRIORITA'

DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		Tipo	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		Tipo	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		Tipo	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
FIRMA DEL / DEI RICHIEDENTE / I					

999 B - LOVINO Paolo
STUDIO TORTA S.R.L.

PROSPETTO MODULO A
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

Ns.Rif.:3/3996

NUMERO DI DOMANDA:

10 2003A001048

DATA DI DEPOSITO:

30/12/2003

A. RICHIEDENTE/I COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE, RESIDENZA O STATO ;

1) BENATTI UMBERTO - VIA ACQUARONE 10/7, 16125 GENOVA; 2) BRANDI GIORGIO - VIA DEI PARTIGIANI 14, 61033 FERMIGNANO (PU); 3) GARACI ENRICO - VIA SALARIA 237, 00198 ROMA; 4) MAGNANI MAURO - TORRE SAN TOMMASO, 61029 URBINO; 5) MILLO ENRICO - CORSO EUROPA 632/7, 16148 GENOVA; 6) PALAMARA ANNA TERESA - VIA CARDINAL DE LUCA, 22, 00196 ROMA; 7) ROSSI LUIGIA - VIA G. SANTI 2, 61029 URBINO

C. TITOLO

DERIVATI DEL GLUTATIONE E LORO UTILIZZI PER IL TRATTAMENTO DI MALATTIE VIRALI

SEZIONE

CLASSE

SOTTOCLASSE

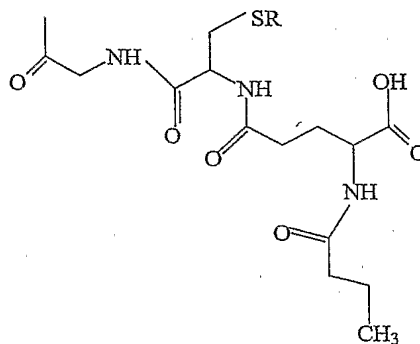
GRUPPO

SOTTOGRUPPO

E. CLASSE PROPOSTA

O. RIASSUNTO

Vengono forniti derivati del glutatione (GSH) di formula I, dove R è un gruppo di protezione del tiolo. I derivati sono utili per il trattamento delle infezioni da Paramyxovirus, Orthomyxovirus, Herpes simplex e virus dell'Immunodeficienza acquisita.



P. DISEGNO PRINCIPALE



FIRMA DEL / DEI
RICHIEDENTE / I

Paolo Lovino

999 B - LOVINO Paolo
STUDIO TORTA S.R.L.

90 DIC. 2003

10 2003A001048

D E S C R I Z I O N E

del brevetto per Invenzione Industriale

di 1) BENATTI UMBERTO,

2) BRANDI GIORGIO,

3) GARACI ENRICO,

4) MAGNANI MAURO,

5) MILLO ENRICO,

6) PALAMARA ANNA TERESA,

7) ROSSI LUIGIA,

tutti di nazionalità italiana,

rispettivamente domiciliati in

1) VIA ACQUARONE 10/7, 16125 GENOVA;

2) VIA DEI PARTIGIANI 14, 61033 FERMIGNANO (PU);

3) VIA SALARIA 237, 00198 ROMA;

4) TORRE SAN TOMMASO, 61029 URBINO;

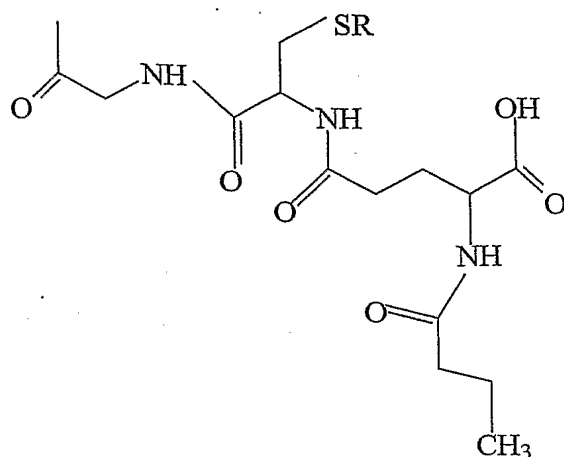
5) CORSO EUROPA 632/7, 16148 GENOVA;

6) VIA CARDINAL DE LUCA, 22, 00196 ROMA;

7) VIA G. SANTI 2, 61029 URBINO

Inventori: BENATTI Umberto, BRANDI Giorgio, GARACI Enrico, MAGNANI Mauro, MILLO Enrico, PALAMARA Anna Teresa, ROSSI Luigia

La presente invenzione si riferisce a derivati del glutatione di formula I:



ed al loro utilizzo come farmaci antivirali, in particolare per il trattamento dei virus dei Paramyxovirus, Orthomyxovirus, Herpes virus e HIV.

Il glutatione (anche noto con la sigla GSH) è un tripeptide (γ -glutamyl-cisteinil-glicina) contenente cisteina che si trova nelle cellule eucariotiche in concentrazioni millimolari ed ha numerose funzioni nella fisiologia cellulare: protegge le cellule dallo stress ossidativo mantenendo lo stato redox intracellulare in condizioni riducenti, attraverso interconversioni metaboliche, nella sua forma ossidata di disolfuro.

È noto e riportato in numerosi articoli, che durante le infezioni virali si verifica una progressiva riduzione del GSH con conseguente alterazione dell'equilibrio redox intracellulare.

Sfortunatamente il GSH in vivo viene rapidamente ossidato, particolarmente in presenza di infezioni

virali, condizione nella quale lo stato redox delle cellule è sbilanciato. Il GSH ossidato viene a sua volta ridotto dalla glutathione riduttasi cellulare o eliminato dalla cellula attraverso un meccanismo ATP-dipendente. La riduzione del glutathione tramite enzimi cellulari dipende dalla disponibilità di equivalenti riducenti nella cellula (NADH, NADPH) che sono già carenti in caso di infezione patogena.

Dati recenti riportano ad esempio che durante infezioni in vitro con virus parainfluenzale 1 Sendai (SV), virus erpetico Herpes Simplex-1 (HSV-1) e virus della immunodeficienza (HIV) si verifica una diminuzione progressiva nei livelli di GSH. Molti studi in vivo riportano inoltre che esiste uno squilibrio dello stato redox nelle cellule e nei fluidi corporei di pazienti affetti da HIV ed epatite C. Inoltre durante le infezioni virali sperimentali con il virus dell'influenza sono state descritte contemporaneamente una diminuzione delle difese antiossidanti ed un aumento di prodotti dell'ossidazione lipidica in polmoni e fegati di animali sacrificati al settimo giorno dopo l'infezione.

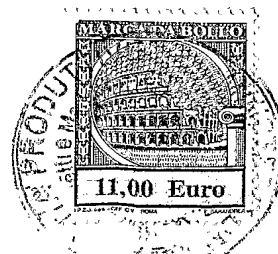
Molti dati suggeriscono che uno squilibrio dello stato intracellulare redox sia un evento chiave nel ciclo replicativo dei virus sia per il fatto di

incrementare la replicazione sia nell'attivare i fattori di trascrizione nucleare.

È inoltre noto che la somministrazione di glutathione ridotto a cellule infette previene il decremento nel GSH intracellulare e inibisce la replicazione virale nelle infezioni da SV, HSV-1 e HIV, come è, ad esempio, riportato nell'articolo di Palamara, A. T., Perno, C. F., Ciriolo, M. R., Dini, L., Balestra, E., D'Agostini, C. et al. (1995) "Evidence for antiviral activity of glutathione: in vitro inhibition of herpes simplex virus type 1 replication" in *Antiviral Research* 27, 237-253, e nell'articolo di Garaci, E., Palamara, A.T., Di Francesco, P., Favalli, C., Ciriolo, M. R. & Rotilio, G. (1992), "Glutathione inhibits replication and expression of viral proteins in cultured cells infected with Senday virus" in *Biochemical and biophysical research communications* 188, 1090-1096.

Nei modelli sperimentali l'attività antivirale del GSH sembra essere correlata ad un'inibizione degli stadi post-trascrizionali della replicazione dei virus, probabilmente impedendo il corretto ripiegamento e la maturazione di specifiche proteine.

L'efficacia delle sostanze antiossidanti nelle infezioni virali è stata dimostrata anche da studi in



LOVINO PAOLO
(iscritto all'Albo nr. 9995)

vivo, in particolare nell'articolo di Palamara, A. T., Garaci, E., Rotilio, G., Ciriolo, M. R., Casabianca, A., Fraternale, A. et al. (1996c) "Inhibition of murine AIDS by reduced glutathione" in AIDS research and human retroviruses 12, 1373-1381.

La somministrazione di alte dosi di GSH riduce l'infezione virale e inibisce il progredire della malattia, per esempio anche in un modello murino di AIDS.

Un problema che però si presenta nell'utilizzazione e nella somministrazione del GSH, problema alla base della presente invenzione, è il fatto che, benché l'attività antivirale delle sostanze antiossidanti sia stata chiaramente dimostrata, è stato altresì provato che il GSH non viene trasportato come tale nella maggior parte delle cellule o dei tessuti.

Per questo motivo sarebbe auspicabile ottenere delle molecole che mantengano le caratteristiche vantaggiose del GSH, ma al tempo stesso permettano di superare il problema del trasporto e che quindi favoriscano il facile attraversamento della membrana cellulare di molti tipi di cellule.

Secondo la presente invenzione tale problema è risolto da derivati del glutathione di formula I.

L'invenzione verrà ora descritta anche con

LOVINO PACIO
(iscritto all'Albo nr. 993B)

riferimento alle figure allegate, ove:

- la Figura 1 mostra la formula di struttura di un derivato del glutathione secondo la presente invenzione ovvero n-butanoil γ -glutamyl-cisteinil-glicina (anche noto con l'abbreviazione GSH-C4) unitamente alla sua analisi in spettrometria di massa dopo purificazione in HPLC. L'analisi, condotta in modalità ioni negativi, ha evidenziato la presenza di un unico picco di massa 376.7 corrispondente alla molecola di interesse monocaricata ($[M-H]^-$).

- la figura 2 mostra l'effetto del GSH-C4 sulla replicazione del virus di Sendai.

- la figura 3 mostra gli effetti del GSH-C4 sulla replicazione dell'HSV-1.

Secondo la presente invenzione i derivati del glutathione (GSH) di formula I permettono di ottenere una forte attività antivirale in vitro, sia contro i virus a RNA (parainfluenza-1, Sendai), sia a DNA (Herpes Simplex, HSV-1), attraversando la membrana cellulare sia di cellule MDCK, sia di cellule Vero, e senza causare effetti tossici sulle cellule non infettate.

Il GSH può essere considerato un agente antimicrobico che esercita la sua attività attraverso meccanismi differenti a seconda del sistema

LOVINO PAOLO
(iscritto all'Albo nr. 999B)

ospite/patogeno considerato e della concentrazione utilizzata.

I derivati della presente invenzione si ottengono mediante la condensazione di un acido carbossilico sul gruppo α -NH₂ dell'acido glutammico.

I composti sono stati sintetizzati in laboratorio utilizzando metodi tradizionali di sintesi peptidica in fase solida.

È stato verificato che il butanoil-glutathione secondo l'invenzione, indicato in seguito per comodità anche con l'abbreviazione GSH-C4, agisce con un meccanismo differente da quello evidenziato per il glutathione (GSH). Infatti, oltre ad inibire significativamente la replicazione di HSV-1, è in grado di prevenire gli effetti citopatici indotti dal virus in cellule Vero, ma inibisce inoltre anche la replicazione del virus parainfluenzale Sendai nelle cellule MDCK, probabilmente interferendo con fattori cellulari essenziali durante l'infezione virale.

Uno dei vantaggi dell'invenzione consiste nel fatto che il GSH-C4 o un suo derivato di formula I può essere preferibilmente utilizzato come farmaco solubile in acqua, ma anche in forma di crema o lozione per la terapia delle patologie da Herpes Simplex 1 e 2 mediante somministrazione topica.

Il butanoil glutatione di formula I può essere considerato un interessante agente antimicrobico contro differenti agenti patogeni, in quanto, secondo una caratteristica dell'invenzione, riduce sia l'infettività virale nei primi stadi delle malattie, che la produzione virale ad uno stadio più avanzato, caratteristica vantaggiosa e che può essere considerata, al momento, unica.

L'invenzione verrà in seguito descritta facendo riferimento ad esempi specifici di realizzazione e di test del derivato secondo l'invenzione, senza per questo che l'invenzione s'intenda limitata agli esempi stessi.

Esempio 1

Sintesi dei derivati del glutatione (GSH-C2, GSH-C4, GSH-C6, GSH-C8, GSH-C12)

I composti sono stati sintetizzati in laboratorio utilizzando metodi tradizionali di sintesi peptidica in fase solida, in particolare è stata utilizzata la tecnica Fmoc (9-fluorenilmetossicarbonil) opportunamente modificata. È stato quindi verificato che il solo butanoil-glutatione GSH-C4 permette di risolvere il problema tecnico alla base della presente invenzione e quindi solo su questo derivato sono stati svolti gli esperimenti successivi.

LOVINO PAOLO
(iscritto all'Albo nr. 999B)



Tutte le sintesi di laboratorio sono state condotte con tecnica manuale utilizzando un opportuno contenitore di reazione contenente una resina polistirenica (Wang-Gly-Fmoc resina prodotta da Novabiochem AG, Laufelfingen, Svizzera) funzionalizzata con una glicina che presenta il gruppo N-terminale protetto dal gruppo Fmoc.

Il ciclo standard di sintesi comprende la fase di pretrattamento della resina attraverso sospensione in diclorometano (Biosolve LTD, Paesi Bassi) per una notte, quindi viene rimosso il gruppo di protezione Fmoc con piperidina (Fluka Chemie AG, Buchs, Svizzera) in N,N dimetilformamide (DMF) (Biosolve LTD, Paesi Bassi) per 20 minuti.

Contemporaneamente 5 equivalenti (eq.) dell'appropriato aminoacido Fmoc (Advanced Biotech Italia, Italia) sono preattivati con 4,5 eq. di O-(benzotriazol-1-il)1,1,3,3-tetrametiluroniumesafluorofosfato (HATU) (Advanced Biotech Italia), 5 eq. of N,N diisopropiletilamina, alla concentrazione finale di 0.2 M in N-metilpirrolidone anidro (Biosolve LTD, Paesi Bassi). Questa soluzione viene fatta reagire con la resina neutralizzata in situ per circa 1 ora a 40°C.

Successivamente è opportuna una fase di reazione

LOVINO PAOLO
(iscritto all'Albo nr. 999B)

con una soluzione di anidride acetica al 5% (Fluka Chemie AG, Buchs, Svizzera) in DMF per evitare reazioni indesiderate dei gruppi amminici eventualmente rimasti liberi.

Esempio 2

Il derivato butanoilglutazione (GSH-C4) è stato preparato per trattamento della resina contenente la porzione peptidica con acido n-butanoico (Fluka Chemie AG, Buchs, Svizzera) preventivamente attivato come già descritto per gli aminoacidi. I derivati etanoil, esanoil, ottanoil e dodecanoil (GSH-C2, GSH-C6, GSH-C8 and GSH-C12) sono stati preparati con metodica simile utilizzando rispettivamente anidride acetica e gli acidi esanoico, ottanoico e dodecanoico (Fluka Chemie AG, Buchs, Svizzera) in sostituzione dell'acido butanoico.

Il distacco del composto sintetizzato dalla resina e la contemporanea rimozione di gruppi protettori presenti sulla catena laterale è stata condotta utilizzando una soluzione formata da acido trifluoroacetico (TFA) (BiosolveLTD, Paesi Bassi), etanditiolo (FlukaChemie AG, Buchs, Svizzera), acqua e triisopropilsilano (FlukaChemie AG, Buchs, Svizzera) in proporzione 92.5:2.5:2.5:1 v/v per un tempo di 2 ore a temperatura ambiente. La soluzione acida è concentrata

LOVINO PACIO
(iscritto all'Albo nr. 9995)

sotto vuoto a circa 1 ml di volume finale ed il prodotto finale precipitato con etere dietilico a freddo e successivamente lavato con il medesimo solvente.

Tutte le molecole sono state purificate tramite cromatografia liquida a fase inversa (RP-HPLC) usando una colonna Waters C18 μ Bondapack, in cui il solvente A era costituito da 0.1% TFA in acqua ed il solvente B dalla stessa percentuale di acido in acetonitrile. L'eluizione dei composti è avvenuta con un gradiente che partiva da 100% di solvente A per 5 minuti, aumentava linearmente fino al 60 % di solvente B in 30 min e infine terminava con il 100 % B in 5 min.

Le frazioni contenenti le molecole d'interesse vengono raccolte, concentrate sotto vuoto e infine liofilizzate. I pesi molecolari dei derivati del glutatione sono stati confermati tramite analisi in spettrometria di massa. Gli spettri di massa di ciascun composto sono stati acquisiti utilizzando uno spettrometro HP Engine 5989-A a singolo quadrupolo equipaggiato con una sorgente elettrospray in modalità ioni negativi. Tutti i prodotti sono stati ottenuti con una resa finale variabile tra il 75-78% ed una purezza del 95% dopo analisi in HPLC. Un esempio degli spettri di massa ottenuti è riportato nella figura 1.

LOVINO PAOLO
Credito all'Albo nr. 9999

Esempio 3

Per gli studi sulla tossicità sulle cellule tutti i composti ottenuti (GSH-C2, GSH-C4, GSH-C6, GSH-C8, GSH-C12) sono stati saggiati su monostrati confluenti di cellule di rene canino Madin Darby non infettate (MDCK). La tossicità è stata valutata sulla base di esami microscopici della morfologia cellulare, sulla valutazione della vitalità cellulare dopo colorazione con trypan blue e sul conteggio delle cellule. Tutti i composti sono stati diluiti in RPMI, il pH finale della soluzione era di circa 7-7,3.

Esempio 4

Sono state eseguite determinazioni enzimatiche dell'attività della glutatione perossidasi (E.C.1.11.1.9.) e glutatione S-transferasi (E.C.2.5.1.18.) in emolizzato umano in presenza di GSH e del suo derivato GSH-C4 secondo il metodo di Beutler (Beutler, E., 1984, *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*, 3rd edn. Grune & Stratton, New York). Il GSH ed il GSH-C4 sono stati quindi ossidati incubandoli a temperatura ambiente in presenza di 35% (v/v) H₂O₂ per ottenere rispettivamente GSSG e C4-GSSG-C4.

Esempio 5

E' stato valutato l'ingresso di GSH e GSH-C4 in



eritrociti (RBCs) a 37°C in provette da microcentrifuga, utilizzando il metodo "oil-stop". Sospensioni di eritrociti al 10 % di ematocrito contenenti 5 mM di GSH o GSH-C4 e 10 mM GSH sono state incubate per 2 h a 37°C. A diversi tempi (0, 5, 15, 30, 60 e 120 min), aliquote di 600 µl sono state stratificate su 600 µl di bromododecano, centrifugate per 5 min a 10,000 g ed il contenuto di GSH and GSH-C4 valutato in RBCs (Beutler, E., 1984, *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*, 3rd edn. Grune & Stratton, New York).

Esempio 6

È stata valutata la stabilità in plasma di GSH-C4 con la seguente procedura: il GSH-C4 (1 mM) è stato incubato in plasma umano a 37°C e a diversi tempi di incubazione (0, 15, 30, 60 e 120 min), aliquote da 200 µl sono state ultrafiltrate utilizzando microconcentratori Amicon Centricon tramite centrifugazione a 2.000 g per 30 min. La soluzione filtrata è stata quindi analizzata tramite elettroforesi capillare ad alta performance (HPCE) per valutare il contenuto di GSH-C4 e C4-GSSG-C4

Esempio 7

Per valutare il comportamento dei derivati del GSH-C4 nelle cellule infettate, sono state cresciute

LOVINO PAOLO
Iscritto all'Albo nr. 9938

cellule di rene canino Madin Darby (MDCK) in RPMI 1640 a cui è stato aggiunto 5% siero fetale bovino deplementato al calore (Flow Laboratories, Italia).

Il virus di Sendai (SV) appartenente alla famiglia dei Paramyxovirus è un virus dotato di RNA a polarità negativa non segmentato ed a singolo filamento. Tale virus, è stato riprodotto mediante inoculazione nel liquido allantoideo di uova embrionate di pollo. I monostrati di cellule MDCK sono stati infettati con SV [3 unità emagglutinanti (HAU) x 10^5 cellule]. Dopo l'incubazione per 1 ora a 37°C (periodo di adsorbimento), i virus non adsorbiti sono stati rimossi, i monostrati sono stati lavati e quindi incubati in un medium completo contenente il 2% di siero fetale bovino. La produzione di virus da parte delle cellule infettate è stata determinata nei sovrinatanti cellulari a diversi intervalli di tempo dall'infezione (p.i.), misurando l'attività emoagglutinante verso eritrociti di tipo umano 0 Rh+ (HAU), secondo procedure standard. Per la valutazione dell'attività antivirale, i composti GSH-C2, GSH-C4, GSH-C6 sono stati diluiti in RPMI pH 7.3 e addizionati alla concentrazione desiderata, subito dopo il periodo di adsorbimento del virus. Cellule di rene di scimmia (VERO) sono state cresciute in RPMI ed addizionate con

LOVINO PAOLO
(iscritto all'Albo nr. 998)

5% di siero. Il virus Human Herpes simplex di tipo 1 (HSV-1) clinicamente isolato (TV1) è stato cresciuto e titolato nelle cellule Vero come descritto in Palamara, A. T., Perno, C. F., Ciriolo, M. R., Dini, L., Balestra, E., D'Agostini, C. et al. (1995). Evidence for antiviral activity of glutathione: *in vitro* inhibition of herpes simplex virus type 1 replication. *Antiviral Research* 27, 237-253.

Per ottenere l'infezione virale, monostrati di cellule Vero sono state infettate con HSV-1 a m.o.i. (molteplicità d'infezione) di 0.03 PFU/cellula. Dopo l'incubazione per 1 ora a 37°C (periodo di adsorbimento), i virus non adsorbiti sono stati rimossi, i monostrati sono stati lavati e quindi incubati con terreno di coltura contenente 2% di siero fetale bovino. Il GSH-C4 è stato aggiunto a dosi identiche a quanto sopra riportato subito dopo il periodo di adsorbimento ed è stato mantenuto nel mezzo di coltura fino a completamento degli esperimenti. Supernatanti da cellule infette sono stati raccolti in tempi differenti dopo il contatto con il virus e testati per la capacità di formare placche in cellule Vero, utilizzando un metodo di titolazione standard. Esperimenti simili sono stati condotti anche su HSV-1 TK-D305.

LOVINO PAOLO
(iscritto all'Albo nr. 999E)

I risultati ottenuti sulla base degli esempi descritti sono riassunti qui di seguito.

Tossicità dei derivati del GSH

È stato verificato che i derivati GSH-C4 e GSH-C2 non inducono alcun effetto tossico o cambiamento nella morfologia della cellula alle concentrazioni utilizzate negli esperimenti condotti

Al contrario l'addizione dei derivati C8 (n-ottanoil) e C12 (n-dodecanoil) ha causato marcati effetti tossici e danneggiato le cellule dei monostrati MDCK non infettate. Questi effetti aumentano in modo dipendente dalla dose somministrata e sono stati osservati a partire da concentrazioni 0,1 mM. Per questa ragione la loro attività sulla replicazione virale non è stata considerata. Il trattamento di cellule MDCK con Glutathione-C6 ha indotto danni sugli strati monocellulari non infettati esclusivamente alla concentrazione di 10 mM. Alcune modifiche della morfologia cellulare sono state individuate 24 ore dopo l'addizione di 2,5 e 5 mM. Queste sostanze causano l'inibizione di replicazione virali che variano tra il 50% (2,5 mM) ed il 100% (10mM). A causa della limitata differenza tra le dosi citotossiche e le dosi antivirali, il derivato GSH-C6 è stato scartato in quanto non ottimale.

LOVINO PAOLO
(certificato all. ABB nr. 998)



È stata quindi operata una selezione inventiva tra vari possibili derivati del glutathione col fine di individuare quali fossero potessero ottenere migliori effetti come antivirali ed è stato sorprendentemente scoperto che solo i derivati GSH-C4 secondo la formula I permettono di ottenere adeguata efficacia antivirale e contemporaneamente risolvere i problemi summenzionati correlati all'utilizzo di GSH.

Metabolismo del derivato GSH-C4

Le attività enzimatiche della glutathione perossidasi e glutathione S-transferasi sono state valutate in emolizzato umano in presenza di GSH-C4 o GSH 2 mM come substrati. Le attività della glutathione perossidasi e della glutathione S-transferasi in presenza di GSH-C4 erano di 1.8% e 3.5%, rispettivamente, comparate a quelle in presenza di GSH. Inoltre sono stati chimicamente ossidati il GSH e il GSH-C4 nelle corrispondenti forme disulfidiche (GSSG e C4-GSSG-C4). E' stata valutata l'attività della glutathione reduttasi su entrambi i substrati ed i risultati ottenuti hanno mostrato che la forma ossidata del C4-GSSG-C4 viene ridotta lentamente con un'attività enzimatica di 0,63 IU/g di emoglobina (Hb), una Km da 50 mM ed una Vmax pari a 12.6 $\mu\text{mol/min/mg Hb}$, mentre la forma ossidata del GSH è ridotta dalla glutathione

LOVINO PAOLO
Descritto all'Albo nr. 99951

reduttasi con un'attività di 3,0 IU/g Hb, una Km 1.3 mM e una Vmax 6.3 μ mol/min/mg Hb. Questi risultati dimostrano che una volta formatosi il dimero ossidato del GSH-C4, la glutatione reduttasi cellulare non è in grado di ridurre efficientemente il composto.

Ingresso di GSH-C4 negli eritrociti

L'ingresso di GSH-C4 negli eritrociti è stato valutato e confrontato con quello del GSH. I risultati ottenuti mostrano che il GSH-C4 attraversa le membrane degli eritrociti più velocemente del GSH, risolvendo in questo modo il problema tecnico alla base della presente invenzione; infatti la velocità di ingresso (calcolata nei primi 30 minuti) è stata di 4.33 nmol/min/ml RBCs per il GSH-C4 e di 2.33 nmol/min/ml RBCs per il GSH.

Effetti del GSH-C4 sulla replicazione del virus di Sendai.

È stato osservato che l'addizione di GSH-C2 a cellule MDCK infettate con il virus di Sndai ha causato una leggera riduzione della replicazione virale misurata come attività emoagglutinante nel supernatante.

In particolare l'addizione del derivato del glutatione a concentrazioni di 5,0 e 7,5 mM causa una inibizione del titolo virale rispettivamente del 30 % e

del 40 %.

Viceversa l'addizione di GSH-C4 ha mostrato un effetto molto maggiore. L'effetto del GSH-C4 sulla riproduzione del virus Sendai nelle cellule MDCK è anche mostrato in Fig. 2.

Cellule MDCK sono state infettate per 1 ora con 3 unità emoagglutinanti (HAU) x 10^5 cellule. Le cellule sono state lavate e quindi coltivate in presenza di differenti concentrazioni di GSH-C4 (intervallo tra 0-7.5 mM) per 2 giorni. La produzione di virus è stata saggiata a 24 ore (panello A) e 48 ore (panello B) misurando l'attività emoagglutinante su eritrociti umani di tipo 0 Rh+. Il GSH-C4 inibisce la replicazione del virus Sendai in modo dipendente dalla dose somministrata. Un'inibizione che varia tra l'88% (24h p.i.) e il 93% (48h p.i.) è stata ottenuta in presenza di 5 mM di GSH-C4. Nel sovranatante di cellule trattate con composizione contenente GSH-C4 7.5 mM non è stata rilevata la presenza di virus. La dose di 7.5 mM di GSH-C4 si è perciò rivelata ottimale in quanto sufficiente a produrre un ottimo effetto antivirale, senza risultare tossica per le cellule, come confermato anche da esame microscopico dei monostrati. Il 50% d'inibizione di della riproduzione virale a 48h (EC50) viene ottenuto con GSH-C4 ad una dose di solo 3,6 mM,

LOVINO PAOLO
(Esente all'Albo nr. 999B)

mentre sono necessarie ben 7,6 mM di GSH per ottenere lo stesso risultato

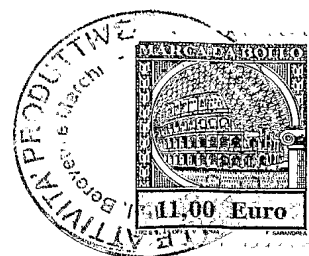
Effetto del GSH-C4 sulla replicazione di HSV-1

L'effetto di diverse dosi di GSH-C4 sulla replicazione di HSV-1 in cellule VERO è mostrato in figura 3, nella quale sono riportate le percentuali d'inibizione della replicazione del virus 48 h dopo l'infezione.

Cellule Vero sono state infettate per 1 ora con HSV-1 a m.o.i. di 0.03 PFU/cellula. Dopo ripetuti lavaggi, GSH-C4 è stato aggiunto a diverse concentrazioni (intervallo 0-10 mM range) alle colture cellulari. La replicazione del virus è stata testata nelle cellule Vero 48 h dopo l'infezione utilizzando la tecnica delle placche. La figura 3 mostra i risultati di quattro diversi esperimenti che concordano entro il 10% dei valori riportati.

I risultati ottenuti mostrano che il GSH-C4 inibisce la replicazione del virus in modo dipendente dalla dose somministrata. Una netta diminuzione (60% d'inibizione rispetto al controllo) nella replicazione virale è stata raggiunta attraverso l'aggiunta di 7.5 mM di GSH-C4. Alla dose di 10 mM, non sono state rilevate particelle di virus nel sovrantante cellulare. La stessa inibizione è stata ritrovata 72 h

LOVINO PAOLO
(iscritto all'Albo nr. 999B)



dopo l'infezione.

L'addizione di GSH ad una concentrazione di 10 mM non induce una inibizione completa del virus e produce solo una riduzione dell'ordine di 2.5 log della replicazione del virus. Inoltre il GSH-C4 protegge le cellule Vero dagli effetti citopatici indotti dal virus e non induce effetti tossici nelle cellule Vero non infettate. L'effetto di GSH-C4 è stato anche valutato su un ceppo di virus difettivo per la timidina-chinasi ($\Delta 305$).

Cellule Vero sono state infettate per 1 h a 37°C con la il ceppo $\Delta 305$ e quindi tenute in coltura in presenza di diverse concentrazioni di GSH-C4. La produzione di virus è stata valutata dopo 24, 48 e 72 h dall'infezione tramite saggio delle unità formanti placca.

La tabella mostra i risultati di un singolo esperimento rappresentativo di tre. La variabilità tra i risultati ottenuti nei vari esperimenti non superava il 10%.

Tab. 1 Effetti del GSH-C4 su HSV-1 TK-

	HSV-1 TK- (pfu/ml)		
	24h	48h	72h
Ctr.	$1,38 \times 10^5$	$1,96 \times 10^5$	$2,56 \times 10^6$
5 mM	$2,59 \times 10^5$	$2,42 \times 10^6$	$2,13 \times 10^6$
7.5 mM	$1,59 \times 10^5$	$2,56 \times 10^5$	$4,33 \times 10^5$

10 mM	1,53 X 10 ⁵	2,6 X 10 ⁵	3,44 X 10 ⁵
-------	------------------------	-----------------------	------------------------

I risultati ottenuti mostrano che il GSH-C4 risulta meno attivo contro il ceppo TK⁻ in confronto a quando viene utilizzato sul ceppo "wild type". Infatti viene osservata un'inibizione significativa del titolo di virus (circa 1 log) solo a concentrazione di 7.5 mM 72 ore dopo l'infezione.

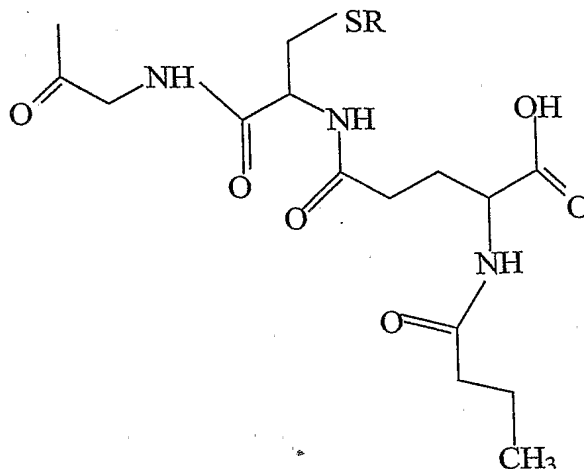
Risulta infine chiaro che poiché è stato verificato sperimentalmente che i derivati secondo la presente invenzione sono efficaci nel trattamento di malattie derivanti dal virus di Sendai e quindi dei paramyxovirus, essi sono altresì efficaci contro gli ortomyxovirus. Poiché inoltre tutte le verifiche effettuate concordano nel confermare l'efficacia contro vari virus, è ovvio desumere che i derivati del GSH-C4 di formula I siano agenti antivirali.

Infine, benché gli esempi siano relativi al derivato del GSH-C4 in cui l'unico gruppo SH non è sostituito, è lecito supporre che tutti i derivati in cui il gruppo SH del GSH-C4 secondo la presente invenzione sia sostituito con gruppi di protezione, siano egualmente efficaci in trattamenti antivirali.

LOVINO PAOLO
(iscritto all'Albo nr. 999B)

R I V E N D I C A Z I O N I

1.- Derivati del glutatione di formula I:



dove R è un gruppo di protezione del tiolo.

2.- Derivati del glutatione di formula I, dove R è H, acetil.

3.- Derivati secondo le rivendicazione 1 o 2, per una utilizzazione come medicamento.

4.- Derivati secondo le rivendicazioni 1 o 2, per una utilizzazione come medicamento antivirale.

5.- Derivati secondo le rivendicazioni 1 o 2, per il trattamento della malattia da Paramyxovirus.

6.- Derivati secondo le rivendicazioni 1 o 2, per il trattamento della malattia da Orthomyxovirus.

7.- Derivati secondo la rivendicazione 1, per un'utilizzazione come medicamento per il trattamento della malattia da Herpes simplex-1.

8.- Derivati secondo la rivendicazione 1, per un'utilizzazione come medicamento per il trattamento

LOVINO PAOLO
(iscritto all'Albo nr. 999B)

della malattia da HIV.

9.- Preparazione farmaceutica caratterizzata dal fatto di comprendere un derivato del glutatione avente formula generale (I) secondo la rivendicazione 1 o 2 o un suo sale farmaceuticamente accettabile ed almeno un eccipiente e/o diluente farmaceuticamente accettabile.

10.- Uso di un derivato del glutatione di formula (I) secondo la rivendicazione 1 o 2 per la produzione di una preparazione farmaceutica antivirale.

11.- Uso di un derivato del glutatione di formula (I) secondo la rivendicazione 1 o 2 per la produzione di una preparazione farmaceutica per il trattamento della malattia da Paramyxovirus.

12.- Uso di un derivato del glutatione di formula (I) secondo la rivendicazione 1 o 2 per la produzione di una preparazione farmaceutica per il trattamento della malattia da Orthomyxovirus.

13.- Uso di un derivato del glutatione di formula (I) secondo la rivendicazione 1 o 2 per la produzione di una preparazione farmaceutica per il trattamento della malattia da Herpes simplex-1.

14.- Uso di un derivato del glutatione di formula (I) secondo la rivendicazione 1 o 2 per la produzione di una preparazione farmaceutica per il trattamento della malattia da virus HIV.

LOVINO PAOLO
(iscritto all'Albo nr. 9993)



- p.i. 1) BENATTI UMBERTO
2) BRANDI GIORGIO
3) GARACI ENRICO
4) MAGNANI MAURO
5) MILLO ENRICO
6) PALAMARA ANNA TERESA
7) ROSSI LUIGIA

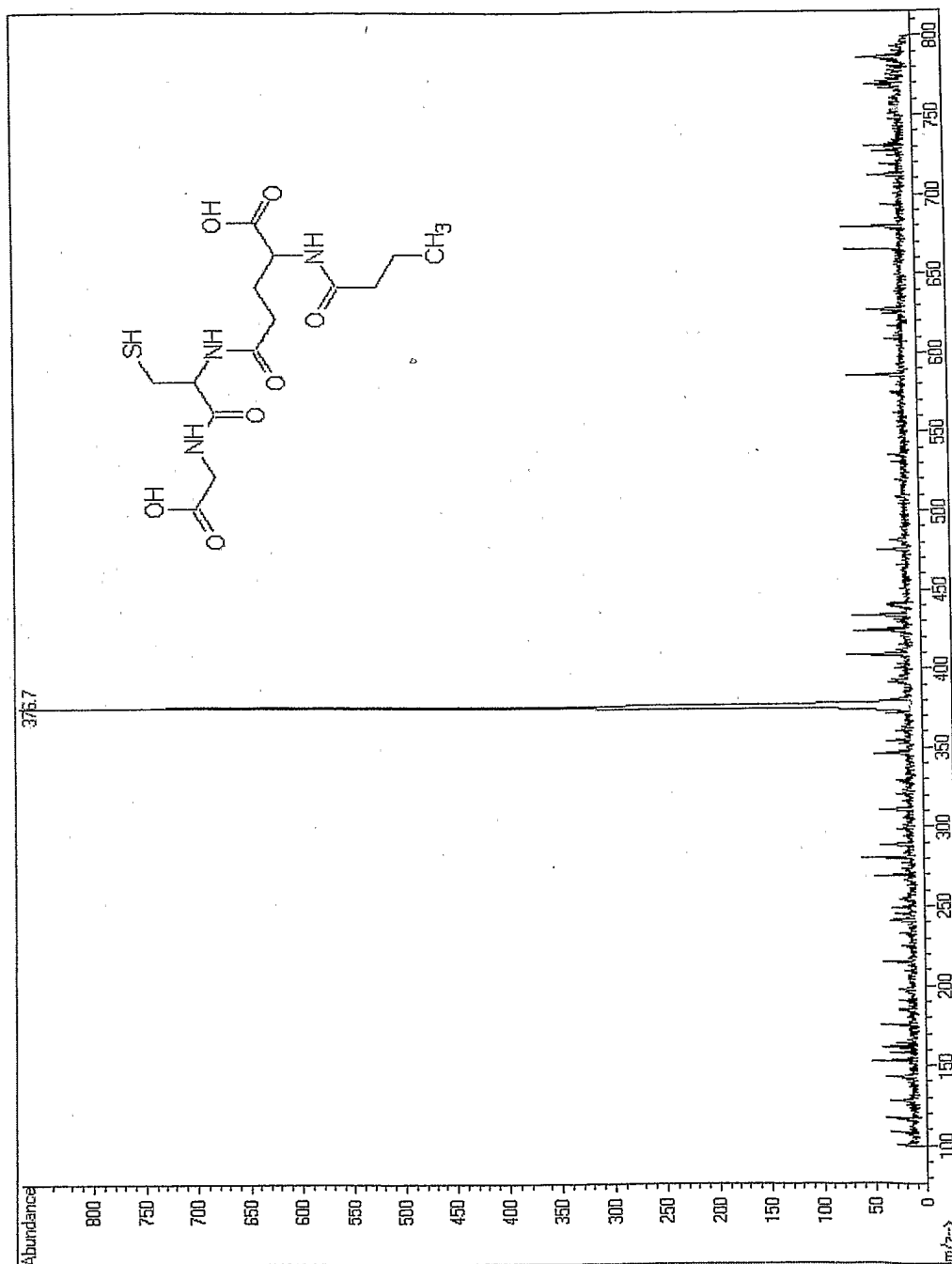
LOVINO PAOLO
(iscritto all'Albo nr. 999B)

Paolo Lovino

LOVINO PAOLO
(iscritto all'Albo nr. 999B)

 CAMERA DI COMMERCIO
INDUSTRIA ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
DI TORINO

Fig. 1



- p.i. 1) BENATTI UMBERTO
2) BRANDI GIORGIO
3) GARACI ENRICO
4) MAGNANI MAURO
5) MILLO ENRICO
6) PALAMARA ANNA TERESA
7) ROSSI LUIGIA LOVIN

LOVINO PAOLO

(Iscritto all' Albo nr. 999B)

 CAMERA DI COMMERCIO
INDUSTRIA ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
DI TORINO

TO 2003A001048

Fig. 2A

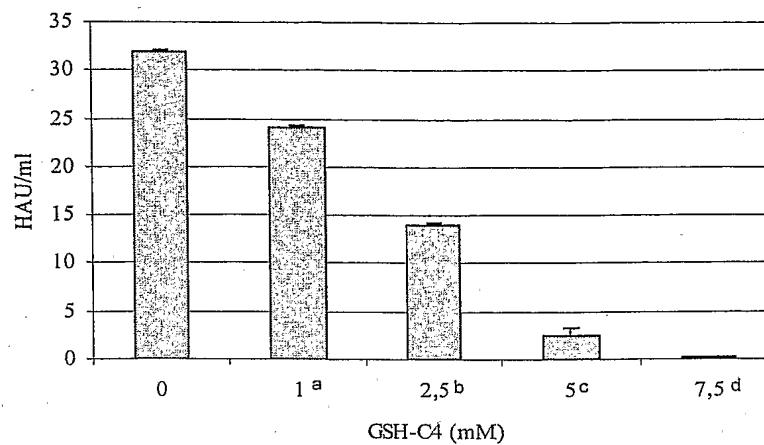
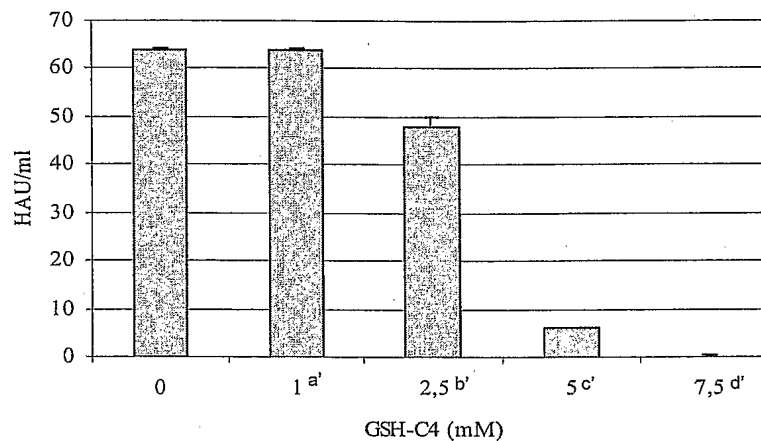


Fig. 2B



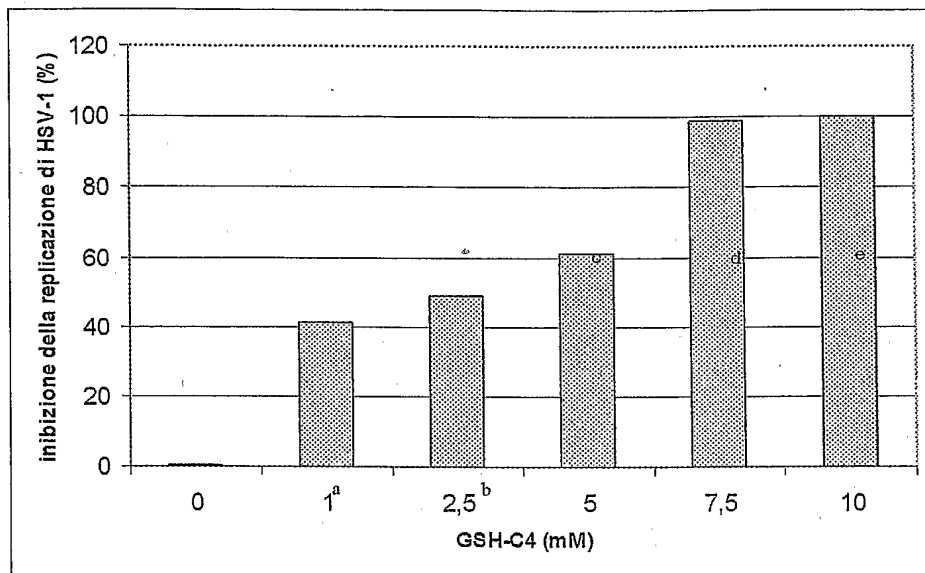
- p.i. 1) BENATTI UMBERTO
 2) BRANDI GIORGIO
 3) GARACI ENRICO
 4) MAGNANI MAURO
 5) MILLO ENRICO
 6) PALAMARA ANNA TERESA
 7) ROSSI LUIGIA

LOVINO PAOLO
 (iscritto all'Albo nr. 999B)

Paolo Lovino

70 2003A001048

Fig. 3



- p.i. 1) BENATTI UMBERTO
 2) BRANDI GIORGIO
 3) GARACI ENRICO
 4) MAGNANI MAURO
 5) MILLO ENRICO
 6) PALAMARA ANNA TERESA
 7) ROSSI LUIGIA

LOVINO PAOLO
 (iscritto all'Albo nr. 9995)

Paolo Lovino



CAMERA DI COMMERCIO
 INDUSTRIA ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
 DI TORINO